

⑫ 公開特許公報(A)

平3-117494

⑪ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)5月20日

C 12 P 17/04

8931-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 17 (全7頁)

⑭ 発明の名称 γ-ラクトン、γ-ラクトンを生成する方法及びγ-ラクトンを含む
有する香料及び食品

⑮ 特 願 平1-313122

⑯ 出 願 平1(1989)12月1日

優先権主張 ⑰ 1988年12月1日 ⑱ 欧州特許機構(E P) ⑲ 88202754.3

⑳ 発 明 者 アーノルダス・ルイ オランダ国、ブーサム、クローム・イングラーン 13
ス・ゲラーダス・マリ
ア・ブーグ

㉑ 出 願 人 ユニリーバー・ナーム オランダ国ロッテルダム、バージミースターズ・ヤコブブ
ローゼ・ベンノートシ レーン 1
ヤーブ

㉒ 代 理 人 弁理士 山崎 行造 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

γ-ラクトン、γ-ラクトンを生成する方法
及びγ-ラクトンを含む香料及び食品

2 特許請求の範囲

(1) γ-ヒドロキシアルカン酸を生成するのに適した基質を含む培地で培養した微生物を用いてγ-ラクトンを生成する方法において、食品級の生成物を生成するのに容器できると一般に考えられ、又γ-ラクトンを代謝しないか、非常に遅くしか代謝しない微生物を、カルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸を含む培地で好氣的に、発酵ブイオン1kg当たり少なくとも0.1gのγ-ヒドロキシアルカン酸及び/又はγ-ラクトン総値を生産するような条件で十分な時間培養し、その後適宜にγ-ヒドロキシアルカン酸をγ-ラクトンに転換し、最初のヒドロキシ脂肪酸が実質的にない

γ-ヒドロキシアルカン酸及び/又はγ-ラクトンを回収することを特徴とする方法。

(2) γ-ヒドロキシアルカン酸を生成するのに適した基質を含む培地で培養した微生物を用いてγ-ラクトンを生成する方法において、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、デバロミセス・ハンセンイ (*Debaromyces hansenii*)、カンジダ・ボイジニイ (*Candida boldinii*)、カンジダ・シルビコラ (*Candida silvicola*)、カンジダ・アピコラ (*Candida apicola*)、ザイゴサッカロミセス・フェルメンタチ (*Zygosaccharomyces fermentati*) 及びトルラスボラ・デルブルッキイ (*Torulaspora delbrueckii*) から成る群から選択された種をカルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸を含む培地で好氣的に、発酵ブイオン1kg当たり少なくとも0.1gのγ-ヒドロキシアルカン酸及び/又はγ-ラクトン総値を生産するような条件で十分な時間

培養し、その後適宜に α -ヒドロキシアルカン酸を α -ラクトンに転換し、最初のヒドロキシ脂肪酸が実質的にない α -ヒドロキシアルカン酸及び/又は α -ラクトンを回収することを持つ方法とする方法。

(3) サッカロミセス・セレビシェー、デバロミセス・ハンセニイ及びカンジダ・ボイジニイから成る群から選択された種を微生物として用いる、請求項2に記載の方法。

(4) α -ヒドロキシアルカン酸を生成するのに適した基質を含有する培地で培養した微生物を用いて α -ラクトンを生成する方法において、リッカロミセス・セレビシェー種を、カルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸を含有する培地で好氣的に、発酵アイソン1g当り少くとも0.1gの α -ヒドロキシアルカン酸及び/又は α -ラクトン総量を生産するような条件で十分な時間培養し、その後適宜に α -ヒドロキシアルカン酸を α -ラクトンに転換し、

最初のヒドロキシ脂肪酸が実質的にない α -ヒドロキシアルカン酸及び/又は α -ラクトンを回収することを持つ方法とする方法。

(5) ヒドロキシ脂肪酸を、脂肪酸エステルの加水分解によって得、加水分解混合物を培地に添加する、請求項1乃至4のいずれか1請求項に記載の方法。

(6) ヒドロキシ脂肪酸を酵素的加水分解により得る、請求項1乃至5のいずれか1請求項に記載の方法。

(7) 培地にヒドロキシ脂肪酸エステル及び適した加水分解酵素を添加することによりその場でヒドロキシ脂肪酸を生成する、請求項6に記載の方法。

(8) ヒドロキシ脂肪酸エステルがグリセロールエステルである、請求項1乃至7のいずれか1請求項に記載の方法。

(9) ヒドロキシ脂肪酸エステルが炭水化物エステルである、請求項1乃至7のいずれか1請求項に記載の方法。

(10) ヒドロキシ脂肪酸がカルボキシル基と、ヒドロキシ基を有する炭素原子との間に10個の炭素原子を有する、請求項1乃至9のいずれか1請求項に記載の方法。

(11) ヒドロキシ脂肪酸がリシノール酸又はジヒドロリシノール酸である請求項10に記載の方法。

(12) ヒドロキシ脂肪酸が3、12-ジヒドロキシバールミチン酸又は3、12-ジヒドロキシペンタデカン酸である、請求項10に記載の方法。

(13) リシノール酸をヒマシ油の加水分解により得る、請求項1乃至8のいずれか1請求項に記載の方法。

(14) α -ヒドロキシアルカン酸を発酵ノイオン中でラクトン化し、 α -ラクトンを回収する、請求項1乃至13のいずれか1請求項に記載の方法。

(15) 請求項1乃至14のいずれか1請求項に記載の方法により得られる α -ラクトン。

(16) 通常の香味成分及び請求項1乃至14のいずれか1請求項に記載の方法により得られる α -ラクトンを含む香味料。

(17) 請求項1乃至14のいずれか1請求項に記載の方法により得られる α -ラクトンを含む食品。

3 発明の詳細な説明

本発明は、カルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸から微生物発酵により α -ヒドロキシアルカン酸を生成し、その後この α -ヒドロキシアルカン酸を α -ラクトンに転換する方法に関する。

数種の α -ラクトンは香料及び香料の感覚刺激特性を改良するのに香料及び香料工業に広く用いられている。香料の用途においては、天然原料から天然と考えられる方法により生成するのが有利であると考えられている。微生物発酵がその方法である。

ヒマシ油又はヒマシ油加水分解物から特定の微生物を用いて α -ヒドロキシデカン酸及びその後 α -デカラクトンを生産する方法は米国特許第4560656号に記載されている。欧州特許公開第

0253993号には基質としてのリシノール酸の用い方が記載され、他の微生物が特定されている。

しかし、先行技術において記載されている微生物は「食品級」と一般に認められているものではない。さらに、先行技術に記載されているほとんどのラクトンより高品質のラクトンを生産する方法に対する要望がある。

特開昭60-66991号及び60-100508号には、少量のリシノール酸で汚染されたヒマシ油の品質を、ヒマシ油に、例えば、サッカロミセス・セレビシエー、ピグア・ファリノサ(*Pichia farinosa*)、カンジダ・ユヂリス(*Candida uchiis*)、ハンセンヌラ・アノマラ(*Hansenula anomala*)又は他の微生物を用いて発酵処理を行なうことにより、改良する方法が開示されている。このように処理をしたヒマシ油は、分散性及び皮膚感が改良されるため、そして香りが乳状及びクリーム状に改良されるために化粧品用途に、より適していると言われている。これらの改良は、リシノール酸の除去及び微量のアーデカラクトンの生成によるもので

ある。しかし、前記特許出願公開公報の例をみると、少量のアーデカラクトンは生成するがリシノール酸の量は発酵前よりも後の方が実際には多くなっている。この方法で、生成するアーデカラクトンはリシノール酸濃度を基準にして1.5%程度、ヒマシ油の量を基準にして400ppm、発酵アイオン1kg当り0.015gという程度である。このように前記日本特許出願公開公報に記載された方法は工業的規模でのアーデカラクトンの生産には適するものではないことが明らかである。

本発明者らはアーヒドロキシアルカン酸を生成するのに適した基質を含有する培地で培養した微生物を用いてアーラクトンを生産する方法において、食品級の生成物を生産するのに容認できると一般に考えられ又、アーラクトン代謝しないか非常に遅くしか代謝しない微生物を、カルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に4以上の偶数個の炭素原子を有するヒドロキシ脂肪酸を含有する培地で好氣的に、発酵アイオン1kg当りアーヒドロキシアルカン酸及

びノ又はアーラクトンを少なくとも0.1g生産するような条件で十分な時間培養し、その後pH7未満でアーヒドロキシアルカン酸をアーラクトンに転換し、最初ヒドロキシ脂肪酸が実質的にないアーラクトン回収する方法を見出した。好ましくは微生物はサッカロミセス・セレビシエー(*Saccharomyces cerevisiae*)、デバロミセス・ハンセンイ(*Debaromyces hansenii*)、カンジダ・ボイジニイ(*Candida boidinii*)、カンジダ・シルビコラ(*Candida silvicola*)、カンジダ・アピコラ(*Candida apicola*)、ザイゴサッカロミセス・フェルメンタチ(*Zygosaccharomyces fermentati*)及びトルラスボラ・デルブルッキイ(*Torulaspora delbrueckii*)から成る群から選択された種である。特に有用なのはサッカロミセス・セレビシエー種である。本方法は発酵アイオン1kg当りアーヒドロキシアルカン酸及びノ又はアーラクトンを少なくとも1g生成するような条件下で行なわれるのが好ましい。

本発明方法において基質として用いる、カルボ

キシル基と、ヒドロキシル基を有する炭素との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸を培地に実質的に純粋な形態で添加してもよいが混合物、例えばヒドロキシ脂肪酸のエステルの加水分解により得られる混合物、の一部として用いてもよい。特に適した混合物はそのようなエステルの酵素的加水分解により得られたものである。酵素的加水分解は培地に添加する前か後のいずれに行なってもよい。培地に添加後に行なう場合は、エステルと適した酵素の混合物を培地に添加すると本発明の工程中に加水分解がおき、それによりその場でヒドロキシ脂肪酸塩を生成する。本発明方法で用いる微生物のいくつかはそれ自体がリパーゼ活性を生じる。その場合は、ヒドロキシ脂肪酸のグリセロールエステルを別の酵素を添加せずに基質として用いる。

ヒドロキシ脂肪酸又はそのエステルは好ましくは天然源から誘導する。天然に見出される適したエステルはヒマシ油に存在するリシノール酸グリセリドのようなヒドロキシ脂肪酸グリセリド及び

ヤラッパ樹脂に見出されるようなヒドロキシ脂肪酸の炭水化物エステルである。オレイン酸から得られる10-ヒドロキシステアリン酸のような、非ヒドロキシ脂肪酸の微生物転換により得られるヒドロキシ脂肪酸も又適している。

このように、本発明方法の適した出発物質は実質的に純粋な、又はヒマシ油の加水分解混合物中に存在するリシノール酸である。水素化ヒマシ油の加水分解により得られたジヒドロリシノール酸も又適している。これらの場合、本発明方法により γ -ヒドロキシデカン酸そして最終的には γ -デカラクトンを生成する。他の適した出発物質は加水分解したヤラッパ樹脂から得られる3、12-ジヒドロキシパルミチン酸及び3、12-ジヒドロキシペンタデカン酸であり、これらはそれぞれ γ -オクタラクトン及び γ -ヘプタラクトンを生成する。これらのヒドロキシ脂肪酸はすべてカルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に10個の炭素原子を含有することで共通している。

適した微生物種は系統立った微生物保存機関又

は商業的供給先のようなよく知られた供給先から得られる。市販のサッカロミセス・セレビシェー種の例としては、

キッツィンジャー・ラインヘーフェ・オール・パーバセス・ドライイースト (Kitzinger Reinhefe all purposes dry yeast)

キッツィンジャー・ラインヘーフェ・サモス (Kitzinger Reinhefe Samos)

キッツィンジャー・ラインヘーフェ・スタインベルグ (Kitzinger Reinhefe Steinberg)

ポール・アラウナー (Paul Arauner)、西独
フルミパン・インスタントイースト (Iermipan instant yeast)

フュロチン・インスタントイースト (Ierotin instant yeast)

ギストーブローケデス (Gist-Brocades)、ザル
フト、オランダ

シャンペイン・ドライイースト

ラインワイン・ドライイースト

ソーテルヌ・ドライイースト

トクイヤー (Tokayer)・ドライイースト

ソープレッセ・インポート (Souplesse Import)、
オランダ

ビエルカ (Vierka)・ワインイースト "シャブリス
(Chablis)"

フリードリッヒ・ザウアー (Friedrich Sauer)、
西独

フレイッシュマン (Fleischmann)・アクザブ・ドラ
イイースト

スタンダード・ブランド・インコーポレーテッド
(Standard Brands Inc.)、ニューヨーク州、
米国

ワインイースト・ブローエルケン (Wine yeast
Broerken)

リバティ・ネダーランド (Liberty Nederland)、
オランダ

ブリューワース (Brewers)イースト

ジャン・デッカー (Jan Dekker)、ウォーメル
ビール (Wormerveer)、オランダ

ベーカー・スイースト

ブラッグマン (Bruggeman)、ベルギー

本発明方法の発酵は、pH3乃至9、好ましくは4.5乃至7.5、より好ましくは5乃至7.2で行なう。温度は10乃至40℃、好ましくは15乃至35℃に保たなければならない。通気を好ましくは発酵フイオンの pO_2 を液相の10%より多く保つように調節する。

適した培地は、通常の栄養素、例えば炭素源、窒素源、無機塩、成長因子及び微量元素を含む。適した炭素源は当技術分野で知られており、糖類及び糖類由来ポリオール、グリセロール、及び乳酸、クエン酸、コハク酸、アスコルビン酸のような有機酸を含む。適した窒素源にはペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープ・リカー (corn steep liquor) 及びアミノ酸である。バランスがよくとれた培地は好ましくは、少なくとも少量の酵母エキスを含有し、酵母エキスはほとんどの場合、ビタミン類、無機塩、微量元素等を別に添加する必要をなくす。

特にバランスの良い培地は少なくとも酵母エキ

スを 0.1% w/w 及びペプトンを 0.25 % w/w 以上含有する。

ある場合には、例えば腐蝕第一鉄として Fe^{2+} を 20mg/kg 以下添加することが有利である。好ましくは、培地に少なくとも1000細胞/kg接種する。基質として用いるヒドロキシ脂肪酸は、炭素源として培養の初めに、又はより後の段階、例えば細胞が最大量に達したとき、のいずれかに割合よく添加される。ヒドロキシ脂肪酸は供給回分式操作において、又ヒドロキシ脂肪酸エステル及び適した酵素、例えばリパーゼを培地に添加することにより徐々に添加してもよく、酵素中に徐々にヒドロキシ脂肪酸を遊離させる。

ヒドロキシ脂肪酸も又、鉱油又は炭化水素又は微生物がそれ自身でリパーゼ活性を生じない場合は植物又は動物由来のグリセリド油のような微生物に有用でない適した有機溶媒に溶解して添加し得る。どちらの場合でも総量がヒドロキシ脂肪酸の少なくとも 0.1重量%、好ましくは1重量%より多い量を培地に添加する。

発酵フイオンの抱立ちは従来の消泡剤を添加することにより防止できる。

反応生成物は通常、 γ -ヒドロキシアルカン酸及びそれに相当する γ -ラクトンの混合物から成る。この混合物は通常の技術、例えば適した吸収剤又は有機溶媒で抽出することにより発酵フイオンから分離できる。ヒドロキシ脂肪酸基質が溶液として有機溶媒中に添加されるとき、反応生成物も又その溶媒中に溶解し、溶媒は発酵フイオンから単に分離される。その後、 γ -ヒドロキシアルカン酸はpH7未満で常法により γ -ラクトンに転換される。代替的にはpH7未満、好ましくは5未満に低くし、必要なら穏和な加熱によりラクトン化を最初に完了させる。ラクトンも又、抽出及び精製、所望なら蒸留により発酵フイオンから分離される。

本発明方法により得られるラクトン類はそのまゝ又は適当な溶媒に溶解して又は粉末生成物に加工して香料又は食品に添加される。本発明物質のラクトン類とともに用いられる香料成分は、

通常24乃至36時間以内に、発酵フイオン1kg当り γ -ラクトン及び γ -ヒドロキシアルカン酸の総量は 0.1g に達し、一般に10日以内に最大量に達する。多くの場合、非常により短い期間で最大量に達する。しかし従来技術の発酵方法とは異なり、本発明の方法においては γ -ラクトン含量は最大量に達した後、時間とともに減少しないか減少しにくいので正確な発酵時間は臨界的ではない。このようにラクトンは発酵フイオン中で実質的に安定である。

所望なら微生物を、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・アプライド・マイクロバイオリジー・アンド・バイオテクノロジー (Eur. J. App. Mic. & Biotech.) 第15巻 (1982年)、第147乃至152頁及びバイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotech. & Bioeng.) 第19巻 (1977年)、第387頁以下に記載されているような通常の技術を用いて担体に固定し得る。

培地中への基質の分散を容易にするために適した乳化剤を培地の1% w/w 以下の量で添加し得る。

当技術分野でよく知られており、又、例えば S. アークタンデル (Arctander) 著 パフューム・アンド・フレーバー・マテリアルズ・オブ・ナチュラル・オリジン (Perfume and Flavor Materials of Natural Origin) (エリザベス、ニュージャージー州、米国、1969年) 及び T.C. フリア (Furia) 等著 シーアールシー・フェサロリス・ハンドブック・オブ・フレーバー・イングリーディエント (C.R.S. Fernaroli's Handbook of Flavor Ingredients) 第2版 (クリーブランド、CRC プレス・インコーポレーテッド、1975年) 及び H.B. ヒース (Heath) 著、ソース・ブック・オブ・フレーバース (Source Book of Flavors) [ジ・アビ・パブリッシング・カンパニー・インコーポレーテッド (The Avi Publishing Company Inc.) ウェストポート、コネチカット州、1981年] 中に記載されている。

本発明を下記の実施例により例示するが本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

バッフル付き (baffled) フラスコに入れた、ペプトン 2% w/w、酵母エキス 0.5% w/w 及びヒマシ油加水分解物ナウルアシッド (Nouracid) CS80 [アクゾ社 (アーメルスフォールト、オランダ) 販売] 32% w/w から成り、オートグレーブ処理した (120 °C で 20 分間) 培地 100 ml にサッカロミセス・セレピシエー (キッシンジャー・ラインヘーフェ・オール・バーバセズ・ドライイースト) を 4×10^4 細胞接種した。培地の pH は 6.5 で発酵全工程中不変にした。培地をロータリーストレーカー (rotary straker) 上で 28 °C で 5 日間インキュベートした。

試料を定期的に取り出し本方法の進行を決定した。酸性化、酢酸エチルで抽出及び気-液クロマトグラフィーを用いて酢酸の分離を行なった後、アーデカラクトンの濃度を測定する。約 20 時間の誘導期後、アーデカラクトンの濃度は発酵の終りまでずっと増加した。発酵の終りにブイオンを希硫酸を用いて pH 3 に酸性化し、上記のように抽出した。有機層を分離し、溶媒を蒸発させた。残留物

を蒸留し、アーデカラクトンが得られた。発酵ブイオンからアーデカラクトンが 2.06 g/kg 得られ、これはヒマシ油加水分解物中の添加したリシノール酸を基準にして、約 13% のモル収率であった。約 87% のリシノール酸がブイオンから回収されたので発酵収率は代謝されたリシノール酸を基準にして 100% である。

実施例 2

サッカロミセス・セレピシエー種、ATCC24903 を用いヒマシ油加水分解物ナウルアシッド CS80 を 2.7% w/w 添加した他は実施例 1 に記載した工程及び物質を用いて発酵を行なった。発酵ブイオンから 3.75 g/kg のアーデカラクトンが得られ、これは添加したリシノール酸を基準にして約 30% のモル収率であった。約 70% のリシノール酸が変化しないで回収されたので代謝されたリシノール酸のモル収率は 100% であった。

実施例 3

サッカロミセス・セレピシエー種としてフェルミバン・インスタントイースト (ギストープロー

ケーデス、デルフト、オランダ) を用い、3.1% w/w のヒマシ油加水分解物から出発して発酵を行なった。他は実施例 1 に記載の工程及び物質を用いた。発酵ブイオンから 2.1 g/kg のアーラクトンが得られた。

実施例 4

ヒマシ油加水分解物の代わりに精製リシノール酸を 2.7% w/w 用いた他は実施例 1 を繰り返した。実施例 1 において得られたのと同じ結果が得られた。

実施例 5

ヒマシ油加水分解物の代わりに 3.2% w/w のヒマシ油及び 23 ppm/w のシグマ・ケミー・ゲーエムベーハー (Sigma Chemie GmbH) [ダイセンホーフェン (Deisenhofen)、西独] のリパーゼ L1754 の混合物を用いる他は実施例 1 を繰り返した。実施例 1 と同じ結果が得られた。

実施例 6

実施例 1 で記載した培地 1 l を用い、キッシンジャー・ラインヘーフェ・オール・バーバセズ・

ドライイーストを 4×10^5 細胞接種して 1 l 用の発酵槽 [アノリコン (Applikon) (シーダム、オランダ) 販売] 中で発酵を行なった。発酵中、pH は約 6.5 であった。温度を 28 °C に保ち、通気量は 0.1vvm であり攪拌割合は 500 回転/分であった。発酵ブイオンの立ち上りを防ぐため、発酵の最初に消泡エマルジョン M-10 [ジメチコン (Dimethicone)、ビエスターベルト (Biesterveld)、アルフェン a/d ライン (Alphen a/d Rijn)、オランダ] を 100 単位 ppm 添加した。発酵の進行は実施例 1 に記載されたとおりである。5 日後にアーデカラクトンは最大量に達した。ブイオンを pH 3 に酸性化し、ラクトンを実施例 1 に記載したように単離した。アーデカラクトンの収率は 2.5 g であった。

実施例 7

下記の表に記載した微生物種を用い、実施例 1 に記載の工程及び物質を用いて発酵を行なった。各微生物種において添加したリシノール酸の量 (% w/w) 及び得られたアーデカラクトン (g/kg) は下記の通りであった。

微生物種	リシノール酸	γ-デカラクトン
ゲイジサカカミセス・フェルメンタチ Q104420	4	0.54
カンワダ・ボイウニイ Q110385	4	1.80
カンワダ・シルビコラ Q110393	4	0.60
カンワダ・シルビコラ Q110393	1*	0.17
カンワダ・アビコラ Q102267	4	0.62
トルラスボラ・デラルツキイ Q101900	4	0.60

* この場合は加水分解されていないヒマシ酸を基準として添加した。

特許出願代理人

弁理士 山崎 行 彦

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
// A 23 L 1/226	E	7823-4B
(C 12 P 17/04		
C 12 R 1:865)		
(C 12 P 17/04		
C 12 R 1:645)		
(C 12 P 17/04		
C 12 R 1:72)		

⑦発明者	アドリアヌス・マーテ イヌス・バン・グリーン スベン	オランダ国、オス、ドーレンストラート 1
⑦発明者	アルフオンス・ロデウ イーク・ヨゼフ・ビー タース	オランダ国、ブーサム、ジェイ・エイチ・バン・ト・オフ ベグ 24
⑦発明者	ロベルト・ルース	オランダ国、ブーサム、ゲンティアーンストラート 46
⑦発明者	アンドラス・ヤノス・ ウィーグ	オランダ国、アムステルダム、ミュリロストラート10-2

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

平成 4. 4. 7 発行
手 続 補 正 書



平成 3年11月28日

平成 1 年特許願第 313122 号 (特開平 3-117494 号, 平成 3 年 5 月 20 日 発行 公開特許公報 3-1175 号掲載) については特許法第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。 1 (1)

Int. Cl. 1	識別記号	庁内整理番号
C12P 17/04		8931-4B
// A23L 1/226		E-7823-4B
(C12P 17/04		
C12R 1:865)		
(C12P 17/04		
C12R 1:645)		
(C12P 17/04		
C12R 1:72)		

特許庁長官 殿

- 1 事件の表示
平成1年特許願第313122号
- 2 発明の名称
γ-ラクトン、γ-ラクトンを生成する方法及びγ-ラクトンを含有する香料及び食品
- 3 補正をする者
事件との関係 特許出願人
名 称 ユニリーバー・ナムローゼ・ベンノートシャープ
- 4 代 理 人
住 所 東京都千代田区永田町1丁目11番28号
相互永田町ビルディング 3階 電話 3581-9371
氏 名 (7101) 弁理士 山 崎 行 造
同 所
氏 名 (7603) 弁理士 木 村 博
同 所
氏 名 (9766) 弁理士 日 野 修 男
- 5 拒絶理由通知の日付
平成 年 月 日
- 6 補正の対象
明細書。
- 7 補正の内容
別紙のとおり。

方 式 長 (印)



1 特許請求の範囲の範囲を以下の通り訂正する。

- 「(1) γ-ヒドロキシアルカン酸を生成するのに適した基質を含有する培地で培養した微生物を用いてγ-ラクトンを生成する方法において、食品級の生成物を生成するのに容認できると一般に考えられ、又γ-ラクトンを代謝しないか、非常に遅くしか代謝しない微生物を、カルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸を含有する培地で好氣的に、発酵ブイヨン1kg当り少なくとも0.1gのγ-ヒドロキシアルカン酸及び/又はγ-ラクトン総量を生産するような条件で十分な時間培養し、その後適宜にγ-ヒドロキシアルカン酸をγ-ラクトンに転換し、最初のヒドロキシ脂肪酸が実質的にないγ-ヒドロキシアルカン酸及び/又はγ-ラクトンを回収することの特徴とする方法。
- (2) γ-ヒドロキシアルカン酸を生成するのに適した基質を含有する培地で培養した微生物

を用いてγ-ラクトンを生成する方法において、サッカロミセス・セレビシエー (*Saccharomyces cerevisiae*)、デバロミセス・ハンセニイ (*Debaromyces hansenii*)、カンジダ・ボイジニイ (*Candida boidinii*)、カンジダ・シルビコラ (*Candida silvicola*)、カンジダ・アピコラ (*Candida apicola*)、ザイゴサッカロミセス・フェルメンタチ (*Zygosaccharomyces fermentati*) 及びトルラスボラ・デルブルッキイ (*Torulaspora delbruckii*) から成る群から選択された種をカルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸を含有する培地で好氣的に、発酵ブイヨン1kg当り少なくとも0.1gのγ-ヒドロキシアルカン酸及び/又はγ-ラクトン総量を生産するような条件で十分な時間培養し、その後適宜にγ-ヒドロキシアルカン酸をγ-ラクトンに転換し、最初のヒドロ

平成 4. 4. 7 発行

キシ脂肪酸が実質的にないγ-ヒドロキシアルカン酸及び／又はγ-ラク톤を回収することを特徴とする方法。

- (3) サッカロミセス・セレビシエー、デバロミセス・ハンセニイ及びカンジダ・ボイジニイから成る群から選択された種を微生物として用いる、請求項2に記載の方法。
- (4) γ-ヒドロキシアルカン酸を生成するのに適した基質を含有する培地で培養した微生物を用いてγ-ラク톤を生成する方法において、サッカロミセス・セレビシエー種を、カルボキシル基と、水酸基を有する炭素原子との間に炭素原子を4以上の偶数個有するヒドロキシ脂肪酸を含有する培地で好氣的に、発酵ブイヨン1kg当たり少くとも0.1gのγ-ヒドロキシアルカン酸及び／又はγ-ラク톤総量を生産するような条件で十分な時間培養し、その後適宜にγ-ヒドロキシアルカン酸をγ-ラク톤に転換し、最初のヒドロキシ脂肪酸が実質的にないγ-ヒドロキシアルカ

ン酸及び／又はγ-ラク톤を回収すること
を特徴とする方法。

- (5) ヒドロキシ脂肪酸を、脂肪酸エステルの加水分解によって得、加水分解混合物を培地に添加する、請求項1乃至4のいずれか1請求項に記載の方法。
- (6) ヒドロキシ脂肪酸を酵素的加水分解により得る、請求項1乃至5のいずれか1請求項に記載の方法。
- (7) 培地にヒドロキシ脂肪酸エステル及び適した加水分解酵素を添加することによりその場でヒドロキシ脂肪酸を生成する、請求項6に記載の方法。
- (8) ヒドロキシ脂肪酸エステルがグリセロールエステルである、請求項1乃至7のいずれか1請求項に記載の方法。
- (9) ヒドロキシ脂肪酸エステルが炭水化物エステルである、請求項1乃至7のいずれか1請求項に記載の方法。
- (10) ヒドロキシ脂肪酸がカルボキシル基と、水

酸基を有する炭素原子との間に10個の炭素原子を有する、請求項1乃至9のいずれか1請求項に記載の方法。

- (11) ヒドロキシ脂肪酸がリシノール酸又はジヒドロリシノール酸である請求項10に記載の方法。
- (12) ヒドロキシ脂肪酸が3,12-ジヒドロキシバルミチン酸又は3,12-ジヒドロキシペンタデカン酸である、請求項10に記載の方法。
- (13) リシノール酸をヒマシ油の加水分解により得る、請求項1乃至8のいずれか1請求項に記載の方法。
- (14) γ-ヒドロキシアルカン酸を発酵ブイヨン中でラクトン化し、γ-ラク톤を回収する、請求項1乃至13のいずれか1請求項に記載の方法。
- (15) 請求項1乃至14のいずれか1請求項に記載の方法により得られるγ-ラク톤。
- (16) 通常の香味成分及び請求項1乃至14のいずれか1請求項に記載の方法により得られるγ

ーラク톤を含有する香料。

- (17) 請求項1乃至14のいずれか1請求項に記載の方法により得られるγ-ラク톤を含有する食品。」
- 2 明細書、6頁20行「4560656号に」を「4560656号及びそれに引用されている文献に」に訂正する。
- 3 同、7頁16行「分散性」を「展延性」に訂正する。
- 4 同、10頁1行「ヒドロキシル基」を「水酸基」に訂正する。
- 5 同、11頁13乃至15行「3、12-ジヒドロキシバルミチン酸及び3、12-ジヒドロキシペンタデカン酸であり、」を「3,12-ジヒドロキシバルミチン酸及び3,12-ジヒドロキシペンタデカン酸であり、」に訂正する。
- 6 同、15頁1行（2カ所）、15頁20行、19頁2行（2カ所）、20頁11行、21頁1乃至2行、8行、22頁19行「% v/v」を「v/v %」に訂正する。
- 7 同、15頁10乃至12行「又ヒドロキシ脂肪酸エス

テル…徐々に添加してもよく、」を「又、例えばヒドロキシ脂肪酸エステル及び適した酵素、例えばリパーゼを培地に添加することにより、徐々に添加してもよく、」に訂正する。

8 同、19頁5行「32% w/w から成り、オートグレーション処理」を「3.2 w/w %から成り、オートグレーション処理」に訂正する。

9 同、同頁11行「(rotary straker) 上で」を「(rotary straker) (150rpm) 上で」に訂正する。

10 同、同頁15行「測定する。」を「測定した。」に訂正する。

11 同、22頁5行「攪拌割合」を「攪拌速度」に訂正する。

12 同、同頁11行「とおりである。」を「通りであった。」に訂正する。